Aus der
Universitäts-Kinder-Poliklinik in München
Vorstand: Geheimrat Professor Dr. SEITZ

Untersuchungen zur „Vitalfärbung" roter Blutkörperchen

Auszug aus der

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer hohen medizinischen Fakultät der

Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

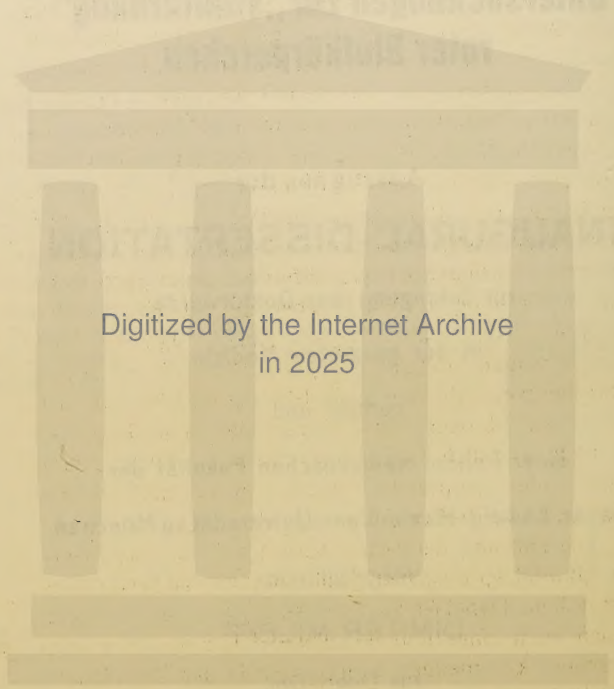
vorgelegt von

DIMITER MILEFF

aus Dobri-Del,
(Bulgarien)

*

München 1926.



Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/untersuchungenzu0003dimi

Seitdem Ehrlich darauf aufmerksam gemacht hat, daß man die Nerven lebender Tiere dadurch färben kann, daß man ihnen Lösungen von rektifiziertem Methylenblau in die Blutbahn einspritzt, haben viele Forscher das Verhalten auch anderer Gewebe in derselben oder ähnlichen Weise geprüft. Man ist schließlich zu der Überzeugung gekommen, daß eigentliche Vitalfärbungen wohl nie vorkommen, weil die lebendige Zelle entweder den Farbstoff nicht aufnimmt oder, wenn derselbe wie Methyenblau doch ins Innere der Zelle dringt, ihn durch Oxydation oder Reduktion unschädlich macht. Dagegen tritt eine Färbung der Zellenwand ein, wenn dieselben abzusterben beginnen. Mithin werden die Vitalfärbungen als nekrobiotische Phänomene aufgefaßt, wobei eine Präexistens der Strukturen Voraussetzung für konstante Ergebnisse ist. Von einer Vitalfärbung sprach man früher dann, wenn man den Farbstoff in die Blutbahn einführte, von einer Supravitalfärbung dagegen dann, wenn man die Färbung in vitro an lebenden, unfixierten Zellen vornahm. Hält man sich vor Augen, daß wir noch keine allgemein gültigen morphologischen Kennzeichen dafür besitzen, ob eine Zelle lebt oder nicht, daß sich auch nach Stunden die Mehrzahl der Blutkörperchen gar nicht merklich ändert, so erscheint die Entscheidung „vital“ oder „supravital“ bezw. „prämortal“ gefärbt nicht leicht zu treffen.

Die Färbung der Zellen beruht auf der verschiedenen Affinität der einzelnen Zellbestandteile zu bestimmten Farbstoffen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beim Gebrauch auch eines und desselben Farbstoffes die zum Vorschein kommenden Strukturdetails der Zelle Unterschiede im Sinne von einer langsameren Färbung, von mehr oder weniger scharfen Konturen des differenzierten Zellteiles zeigen können. Dies weist darauf hin, daß das Bild nicht nur von der präexistierenden Disposition einer bestimmten Substanz im hämoglobinischem Protoplasma abhängt, sondern auch von der chemisch-physikalischen Wirkung des angewandten Farbstoffes, wofür die Feststellung, daß bei Vitalfärbung die verschiedenen Farbstoffe auch etwas voneinander abweichende Bilder liefern, ebenfalls spricht. Die beste Methode,

mit der man die Vitalfärbung vornehmen soll, wäre nach Cesaris-Demel diejenige, bei der man das Blutplasma und die Blutzellen in direkte Berührung mit dem Farbstoffe ohne Anwendung von anderen fixierenden oder lösenden Substanzen bringt. Diese Methode ist zuerst von Pappenheim 1899 angegeben worden. Cesaris-Demel hat sie dahin modifiziert, daß man eine trockene Schicht der färbenden Substanzlösung auf einen Objektträger ausbreitet und darauf einen Tropfen des zu untersuchenden und eben entnommenen Blutes bringt. Der Tropfen Blut breitet sich sodann durch den Druck des daraufgelegten Deckgläschens aus. Der Farbstoff löst sich im Plasma des Blutes und fixiert sich in den Teilen der Blutelemente, für die er Affinität hat. Eine kleinere Quantität des Farbstoffes liefert feinere Bilder und erlaubt die Zeit zu verfolgen, welche die verschiedenen chromatischen Teile je nach ihrer Affinität zu dem Farbstoff brauchen. Man unterscheidet in der chromatischen Substanz der roten Blutkörperchen zwei verschiedene Teile. Der eine dieser Teile, der in verhältnismäßig größerer Menge vorhanden ist, zeigt sich in Form von wellenförmigen oder ineinandergeschwungenen, hie und da durch eine knotenartige Verdickung unterbrochenen Fäden oder Streifen je nach dem angewendeten Farbstoff. Diesen Teil hat Cesaris-Demel Substanz A genannt. Diese Substanz A (Granulofilamentosa) erscheint zeitlich etwas früher gefärbt, als der zweite Teil (Substanz B), der unter normalen Verhältnissen in sehr geringer Menge vorhanden ist und sich in Form von kleinen Körnchen von dem ersten Teile etwas verschieden gefärbt zeigt. Beide Substanzen lassen sich färberisch voneinander gut unterscheiden.

Von der chemischen Konstitution der sich färbenden Substanz kann man aus der Färbung noch nichts Bestimmtes sagen. Nach Overton kommt die Vitalfärbbarkeit durch die Lipoidlöslichkeit der Farbstoffe zustande, bedingt durch die lipoide Oberflächenemulsion der Zelle. Das Substrat der Vitalfärbbarkeit kann nicht lebendes Eiweiß sein, denn solches ist nicht färbbar. Es muß unbelebtes Material, totes, coaguliertes Eiweiß, Fett, Mucin oder dergl. sein, da sich nur dieses als

Substanzdepot innerhalb des lebenden Protoplasmas vital färbt und zwar nach den physikalischen Gesetzen der Adsorption und der starren Lösung. Nach Pappenheim würde die subst. gran.-fil. der roten Blutkörperchen als Fettsäure, die metachromatische Rosin-Demelsche Substanz B als eine Art von Neutralfett oder Clolesterinester aufzufassen sein. Die Versuche Cesaris-Demel's haben gezeigt, daß mit der Schwere der Anämie die Zahl der vitalgefärbten roten Blutkörperchen zunahm, wobei das Verhältnis zwischen Substanz A und B nicht konstant blieb, sondern daß bei schweren Anämien quantitativ die Substanz B überwog. Im embryonalen Leben findet man die Substanz B im Vergleich zu der Substanz A in einer größeren Menge in den roten Blutkörperchen vorhanden als in späteren Lebensperioden.

Das vermehrte Auftreten von vitalgranulären roten Blutkörperchen kommt bei allen möglichen anämischen Zuständen vor, daher kann es nicht als spezifisches Krankheitssymptom verwertet werden. Nach Nägeli machen im embryonalen Blute wie auch im Knochenmarke des Erwachsenen die vitalgranulären roten Blutkörperchen etwa 40 % aller Erytrhozyten und Erythroblasten aus. Im Blute der neugeborenen Tiere sind 30—40 % vital-granuläre rote Blutkörperchen vorhanden. Diese Prozentzahl sinkt bald nach der Geburt für dauernd auf etwa 2—0,5 % und weniger herunter. Das Vorhandensein von vitalgranulären Erythrozyten und Erythroblasten im Blute ist physiologisch, wenn es in rechter Zahl, zu einer rechten Zeit, am rechten Ort zu treffen ist. Aus zahlreichen Versuchen geht hervor, daß die vitalgefärbten roten Blutkörperchen biologisch jungen Zellen entsprechen. Ihr Eintreten in das zirkulierende Blut wird als das sicherste und früheste Zeichen einer reaktiven Überfunktion des Knochenmarkes aufgefaßt. Betreffs Subst. gran. fil. und basophile Punktierung sei bemerkt, daß die erstere nur im Vitalpräparat mit nur zur Vitalfärbung geeigneten Farbstoffen darstellbar ist, während man die basophile Punktierung sowohl im frischen ungefärbten Blute, als auch im vital gefärbten Blute und in fixiertem Blutpräparate sehen kann. Das

chromatische Verhalten der gran. fil. und der basophilen Punktierung ist verschieden.

Wenn man nach Pappenheim und Biondi mit Brillant-Cresylblau vorgefärbtes Blut mit May-Grünwaldscher Farblösung nachfärbt und dann mit verdünnter Giemsalösung überfärbt, so bekommt man ein fixiertes Dauerpräparat, in dem man unter Umständen gleichzeitig Polychromasie, gran. fil., basophile P. und Jollische Körperchen beobachten kann. Danach kann die Vitalfärbbarkeit nicht Ausdruck der Polychromasie bei anderer Technik sein. Naegeli gibt an, daß neugeborene Tiere 30—40% vitalgranuläre rote Blutkörperchen haben, während polychromatische viel spärlicher vorkommen. Die Kontrollfärbungen, die Ferrata und Viglioli herstellten, zeigten, daß unter Umständen in einem Blut, dessen Erythrozyten im fixiert gefärbten Präparate absolut frei von Polychromasie waren, bei Vitalfärbung zahlreiche gran. filament. aufwiesen. Aus den Tatsachen, daß die kernhaltigen roten Blutkörperchen in gewissen Stadien bei Embryonen ausnahmslos polychromatisch sind (Naegeli), daß man in den blutbildenden Organen stets große Mengen mehr oder weniger stark polychromatische kernhaltige und kernlose Erythrozyten trifft, geht hervor, daß ebenso die Vitalfärbbarkeit wie auch Polychromasie Ausdruck für Jugendlichkeit der Erythrozyten ist. Zusammenfassend kann man zur Frage des klinischen Wertes der vitalgranulären roten Blutkörperchen sagen, daß man aus ihrer vermehrten Zahl auf ein Erwachen bezw. eine Steigerung der haematopoetischen Tätigkeit des Knochenmarkes schließen kann. Bei aregenerativen Anämien, wo die haematopoetischen Organe in ihrer funktionellen Reaktion gehindert sind, ist der Blutbefund inbezug auf vitalgranuläre Erythrozyten ein negativer.

Im folgenden wollen wir die Ergebnisse unserer eigenen Untersuchung behandeln. Der Zweck war in erster Linie der, das Auftreten vitalgefärbter Erythrozyten zu prüfen im Verlaufe einer Blutbildveränderung, welche Dr. Maurer bei Verfütterung rachitiserzeugender Nahrungsarten an jungen Ratten beobachtet hatte. Es handelt sich dabei darum, daß offenbar unter dem

Einfluß einer Reizung der blutbildenden Organe im Blut der rachitisch gemachten Tiere Myelocyten und Normoblasten zum Teil in sehr erheblicher Menge zur Beobachtung gelangten.

Wir nahmen die Vitalfärbung hauptsächlich mit Methylenblau in aq. dest. vor. Die verwendeten Objektträger waren in üblicher Weise mittelst conz. H_2SO_4 gereinigt. Die benutzten Deckgläschen waren sehr dünn und ebenfalls sorgfältig gereinigt. Wir entnahmen von dem abgekappten Schwanze der Ratte mit einem reinen Deckgläschen einen Tropfen Blut und ließen ihn sich auf den (nach der beschriebenen Methode von Cesaris-Demel) angefertigten Objektträger durch den geringen Druck des Deckgläschens ausbreiten. Danach umrandeten wir das Deckgläschen mit Vaseline, um Verdunstung zu verhindern, und erhielten auf diese Weise ein gebrauchsfertiges Präparat. Betrachtet man ein solches mit dem Immersionssystem unter dem Mikroskop, so sieht man im Beginne der Betrachtung alle Zellen in ihrer natürlichen Größe und ohne jegliche Veränderung wohl erhalten. Einige Minuten nach der Anfertigung des Blutpräparates nimmt man an einem oder dem anderen Erythrozyten die vitalgefärbte Substanz wahr. Diese Substanz ist im roten Blutkörperchen in einer charakteristischen Anordnung zu treffen. Bei leichtem Erschüttern des Präparates unter gleichzeitiger Beobachtung des mikroskopischen Gesichtsfeldes behält diese intracelluläre Substanz ihre Lagerung im Erythrozyten bei, während aufgelagerte Farbstoffpartikelchen oft ihren scheinbaren Zusammenhang mit dem Blutkörperchen verlieren. Die vitalgefärbten roten Blutkörperchen weisen im allgemeinen noch andere weniger auffällige Merkmale auf. Im Gegensatz zu den ungefärbten roten Blutkörperchen haben sie größere Dimensionen, helleres Protoplasma und beim Druck auf das Deckgläschen des Präparates erweisen sie sich weniger kompressibel. Weiterhin sind sie in der bekannten Stechapfelform entschieden selten anzutreffen. Diese Besonderheiten der vitalgefärbten roten Blutkörperchen denken wir uns dadurch erklärt, daß bei der Färbung der vitalfärbbaren

Subst. in die Erythrozyten Farbstoff und mit ihm Flüssigkeit als Lösungsmittel eindringt. Die Ergebnisse unserer eigenen Untersuchungen bestätigen vor allem die Richtigkeit der Angaben Naegelis, Pappenheims, Cesaris-Demels, Ferratas und anderer Autoren, daß das Blut junger Tiere anfangs reicher sei an Zahl der vitalfärbbaren Erythrozyten. Eine absolute Parallele zwischen dem gehäuften Auftreten kernhaltiger und vitalgefärbter Erythozyten, welche bei den Erscheinungen als Ausdruck einer Reaktion des Knochenmarkes gedeutet zu werden pflegen, konnten wir nicht immer finden. An sich scheint dies keineswegs verwunderlich, wenn man bedenkt, daß der Zahl von 300 pro mille bis 400 pro mille vitalgran. roten Blutkörperchen beim Neugeborenen nicht eine parallele Häufung von Normoblasten entspricht. Wir fanden eine deutliche Bestätigung des Fehlens direkter Korrelation zwischen beiden Erscheinungen darin, daß zur Zeit des Experimentbeginnes (etwa in der 5. Lebenswoche) sehr reichliche Mengen vitalgefärbter Erythrozyten, aber fast nie Normoblasten im Blute unserer Versuchstiere zu finden waren. Weiterhin konnten wir in der großen Mehrzahl der Fälle sowohl eine Parallele zwischen Zahl der vitalfärbbaren und der polychromatischen, als auch eine Parallele zwischen Zahl der kernhaltigen und der polychromatischen Roten beobachten. Bei unseren Beobachtungen hat sich wiederum erwiesen, daß die Zahl der vitalgran. Roten stets größer war, als die Zahl der Polychromatischen im entsprechend gefärbten Präparate. Inbezug auf die Abnahme der Zahl der vitalgefärbten mit fortschreitendem Alter bei ein und demselben Individuum erwies sich bei der Betrachtung der Ergebnisse unserer allwöchentlich vorgenommen Blutauszählungen eine gewisse Ungleichmässigkeit. Wir konnten ferner feststellen, daß die Zahl der vitalfärbbaren Roten bei einem und demselben Tiere, an einem und demselben Tage wechselt. Offenbar waren es geringfügige Reize, die zu Ausschwemmung vitalgegefärbter Erythrozyten führten. Um dies zu prüfen, wurde die entsprechende Reaktion des Knochenmarkes auf Reiz durch Hunger, durch Blutverlust, durch Bestrahlung mit künstlicher Höhensonne festzustellen versucht. Ein Einfluß dieser Reize hat sich zweifelsohne im Sinne der Vermehrung der vitalgefärbten roten Blutkörperchen bemerkbar gemacht.